

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DU DÉVELOPPEMENT INDUSTRIEL
ET SCIENTIFIQUE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

①⑪ 8.157 M

BREVET SPÉCIAL DE MÉDICAMENT

- ②① N° du procès verbal de dépôt 160.776 - Paris.
②② Date de dépôt 26 juillet 1968, à 14 h 59 mn.
Date de l'arrêté de délivrance..... 24 août 1970.

Bulletin Officiel de la Propriété Industrielle.

« Brevets spéciaux de médicaments »..

-
- ⑤① Classification internationale..... A 61 k/C 08 b.

- ⑤④ Polysaccharide sulfaté antilipémique, actif par voie orale.

- ⑦② Invention de :

- ⑦① Déposant : Société dite : ROCADOR S.A., résidant en Espagne.

- ⑦④ Mandataire : Office Blétry.

- ③③ ③② ③① Priorité conventionnelle : *Brevet déposé en Espagne le 9 août 1967,
n° 343.957 au nom de la demanderesse.*

L'invention concerne un nouveau polysaccharide sulfaté antilipémique actif par voie orale.

On connaît la propriété que possèdent les polysaccharides sulfatés (héparinoïdes) d'accroître le pouvoir anticoagulant du sang lorsqu'ils sont administrés par voie parentérale, ainsi que celle de faire disparaître les graisses qui se trouvent en dispersion dans le sérum sanguin, propriété qui semble être particulière aux hauts polymères linéaires qui ont été chargés électriquement par des charges négatives de fait de leur sulfatation. Parmi ces polysaccharides, on connaît en particulier le dextrane sulfaté.

L'activité antilipémique, basée sur la stimulation de libération d'une lipoprotéine-lipase connue sous le nom de "facteur clarifiant" (F.C.), est conditionnée par différents facteurs et notamment par le poids moléculaire du dextrane et son degré de sulfatation. Des poids moléculaires inférieurs à 1200 donnent lieu à des produits inactifs; des poids moléculaires supérieurs à 20 000 donnent lieu à des produits toxiques par administration parentérale. Le poids moléculaire doit donc être convenable et, étant donné qu'il est en rapport avec la viscosité intrinsèque, il convient que celle-ci se situe entre 0,02 et 0,07.

Pour obtenir ces poids moléculaires appropriés, on utilise en général l'hydrolyse du dextrane en milieu acide ou autre milieu oxydant, thermique, enzymatique, etc. Il convient de maintenir le degré de sulfatation entre 10 et 20 % de soufre, sous la forme de son sel potassique, ce qui équivaut à 1 à 3 groupes SO_3 pour chaque groupe monosaccharide. La synthèse du dextrane sulfaté, déjà décrite dans des monographies publiées, consiste à utiliser l'action sulfonante de l'acide chlorosulfonique ou de l'anhydride sulfurique dans des milieux organiques tels que les pyridines, les picolines isolément ou en solution dans la formamide ou similaires, et à maintenir la température de réaction aux alentours de 60°C pendant plusieurs heures. Après refroidissement, neutralisation, filtration et dialyse, on précipite par des solvants organiques le dextrane sulfaté. On peut utiliser différents sels de ces dextranses sulfatés : sodiques, potassiques, ammoniques, ainsi que les sels d'alkyles et d'oxyalkylamines et d'autres bases organiques.

Ces polysaccharides sulfatés héparinoïdes sont caractérisés par la libération de lipoprotéine-lipase lorsqu'ils entrent dans le courant circulatoire d'un animal vivant. Cette libération de lipoprotéine-lipase peut être mise en évidence par la diminution de la turbidité qui se manifeste au mélange de 2 cm³ de plasma citraté, extrait 10 minutes après l'injection d'héparine ou deux heures après l'injec-

tion du polysaccharide sulfaté héparinoïde par voie intraveineuse à la dose de 2-4 mg/kg, avec 0,1-0,2 cm³ d'une suspension d'Ediol (marque commerciale de la firme Schenlabs Pharmaceuticals) fraîchement préparée à 5 % : on mesure les densités optiques avant d'effectuer le mélange et au bout de 15 et 30 minutes à la suite du mélange, lequel est maintenu à 37°C, dans des éprouvettes de 1 cm et avec un filtre rouge.

On peut ainsi apprécier le pouvoir antilipémique de ces polysaccharides sulfatés héparinoïdes en comparaison de celui de l'héparine, au moyen du tableau suivant de densités optiques :

10

| | | <u>Héparine</u> | <u>Polysaccharide sulfaté</u> | |
|-------|-------|-----------------|-------------------------------|---------|
| Doses | | 3,5 mg/kg | 2,5 mg/kg | 3 mg/kg |
| Temps | 0 mn | 0,540 | 0,545 | 0,535 |
| 15 | 15 mn | 0,450 | 0,360 | 0,305 |
| | 30 mn | 0,370 | 0,295 | 0,265 |

L'administration parentérale du produit souffre de la difficulté d'administration d'une drogue dont l'activité dure 6 heures et qui devrait logiquement être administrée au moins deux fois par jour.

D'autre part, l'administration par voie orale s'est révélée peu efficace, du fait de la faible absorption du produit et de sa dénaturalisation dans le tractus digestif, ce qui explique que l'on a recherché des solutions, soit en faisant appel à l'administration simultanée de complexes de calcium ou de magnésium, soit en recouvrant le produit d'un revêtement entérique qui le protège contre le suc gastrique.

Il est possible de déterminer l'absorption orale en mesurant l'élévation de concentration d'acides gras libérés aux dépens des triglycérides à la suite d'un repas gras, en prélevant des échantillons de sang à différentes périodes de temps avant et après l'administration du médicament. Il est possible de mener à bien le dosage au moyen de la méthode de Dole et Kern (J. Lipid. Research. 2; 51, 1961) selon laquelle les résultats sont exprimés en micromoles d'acides gras par cm³ de sérum. Les chiffres normaux sont de l'ordre de 0,4 à 0,7 micromoles, mais il est possible d'obtenir des dextrans sulfatés qui, sans addition de complexes ni revêtement entérique, élèvent le taux d'acides gras à des valeurs de 1 à 1,2 micromoles par cm³ lorsqu'ils sont adsorbés à la dose de 150 mg.

Or le polysaccharide sulfaté selon l'invention permet une élévation de ce taux d'acides gras jusqu'à des valeurs de 2 à 3 micromoles par cm³ lorsqu'il est absorbé à la dose de 150 mg.

Le polysaccharide sulfaté selon l'invention consiste en un sel d'hydrodextrane sulfaté, avec une teneur en S de 1 à 3 moles par groupe monosaccharide et n'étant pratiquement pas réducteur d'après la méthode de Somogyi. De préférence, sa viscosité intrinsèque à 25°C est comprise entre 0,02 et 0,07.

Dans le cadre de l'invention entrent en général tous les sels acceptables pharmaceutiquement. Sont particulièrement intéressants les sels alcalins ayant une teneur en S de 10 à 20 % par rapport au poids total.

Pour aider à la compréhension des notions exposées ci-dessus, il est décrit ci-après quelques modes de réalisation du procédé de l'invention, donnés à titre purement indicatif et nullement limitatif.

Exemple n° 1

Dans un récipient muni d'un reflux et d'un agitateur, on introduit 225 litres d'eau que l'on porte à ébullition. On ajoute 15 kg de dextrane de poids moléculaire 250 000 et 15 litres de $\text{SO}_4\text{H}_2\text{N}$. On fait bouillir pendant plusieurs heures, en contrôlant la viscosité relative à 25°C qui doit atteindre la valeur 1,3. On neutralise avec 1,5 litres de NaOH 10N. On refroidit et on ajoute, dans un récipient approprié, 225 litres d'acétone. On laisse reposer pendant 24 heures et, à partir de la fraction limpide décantée, on reprécipite le dextrane contenu en ajoutant encore 225 litres d'acétone. Le précipité obtenu dissout dans 50 litres d'eau est dialysé à l'eau courante pendant 24 heures. On concentre à 200 litres les liquides obtenus et on précipite par 400 litres d'alcool isopropylique.

Le précipité obtenu contient environ 4 kg de dextrane ayant une viscosité intrinsèque à 25°C de 0,05 et un pouvoir réducteur équivalent à 7 % du glucose d'après la méthode de Somogyi.

Après quoi, le dextrane obtenu est dissous à 20 % dans l'eau et soumis à une hydrogénation. A cette fin, la solution (20 litres) est rendue alcaline au moyen de 150 cm³ de NaOH à 40 % en volume et on la place dans la zone cationique d'un voltamètre à cathode de mercure d'une surface de 4 dm² environ. Dans un récipient poreux de 500 cm³ environ, on introduit une solution de sulfate de sodium à 10 %. L'anode, en platine, mesure environ 15 cm de longueur pour 2,5 mm de diamètre. On fait passer un courant de 10 ampères environ et on soumet l'ensemble à la réfrigération. Un agitateur maintient la solution en agitation constante. Périodiquement, on prélève des échantillons dont on détermine le pouvoir réducteur; lorsque celui-ci atteint une valeur qui équivaut par cm³ à 1 mg de glucose, on considère que la réduction est terminée. Après avoir filtré la solution, on élimine son alcalinité à l'aide de résine cationique Lewatite S-100 (marque commerciale de la

5 firme Bayer A.G.), en réglant le pH à 6,5-7,0. Après quoi, on précipite la solution avec le double de son volume d'alcool et on laisse reposer pendant deux jours. On décante le liquide supérieur, on recueille le précipité et on le sèche, obtenant ainsi 2,5 kg d'hydrodextrane présentant les caractéristiques suivantes : cendres 6,7 %; pouvoir réducteur équivalent à 50 mg de glucose : 20 g; pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25} = +185^\circ$; viscosité intrinsèque : 0,04.

10 Pour la sulfatation de l'hydrodextrane obtenu, on procède de la manière suivante. Dans un matras de 20 litres muni d'un dispositif agitateur et d'un bain marie susceptible d'être chauffé, on introduit 8 litres de pyridine et, goutte à goutte, on y ajoute 1,8 litres d'acide chlorosulfonique. Une fois terminée la réaction, on verse sous agitation 1,6 kg d'hydrodextrane. On maintient la température à 65°C pendant 12 heures et on laisse refroidir. On ajoute, sous agitation

15 et refroidissement, 3,3 litres d'une solution de soude caustique à 70 % en volume. On laisse reposer et l'on décante la partie supérieure pyridinique. La masse inférieure est dissoute à l'eau jusqu'à 20 litres et l'on ajoute 4 litres d'hypochlorite de sodium, la masse devenant ainsi limpide. On maintient la température à 37°C et on ajoute 20 litres

20 d'alcool. On laisse reposer et l'on procède à une nouvelle dissolution jusqu'à 16 litres d'eau; en maintenant le pH à 9, on reprécipite en vue d'éliminer la pyridine. Finalement, on dialyse et on précipite à l'aide de solvants le sel sodique d'hydrodextrane sulfaté. Après dessiccation, on obtient 3 kg environ de produit. Après injection de

25 2 mg/kg de poids à des lapins, on obtient au bout de deux heures un plasma qui, mélangé d'Ediol à 5 % (0,1 cm³ d'Ediol dans 2 cm³ de plasma), présente après 15 minutes une densité optique qui s'abaisse aux environs de 0,5 dans des éprouvettes de 1 cm maintenues à 37°C.

30 Les caractéristiques physicochimiques du sel sodique d'hydrodextrane sulfaté sont les suivantes :

| | |
|--|-------------------------------|
| Cendres | 38,7 % |
| Hydrodextrane | 39,5 % |
| Soufre | 14,9 % |
| Pouvoir rotatoire | $[\alpha]_D^{25} = +81^\circ$ |
| 35 Pouvoir réducteur équivalent à 50 mg de glucose | 63,4 g |
| Viscosité intrinsèque | 0,07 |

Exemple N° 2

40 8 kg de dextrane de poids moléculaire 100 000 sont dissous dans 40 litres d'eau bouillante. On laisse refroidir et on ajoute 4 litres d'eau oxygénée de 100 volumes. On place le mélange dans une enceinte à 35-40°C et on obtient une dépolymérisation progressive du produit si l'on prend la précaution de neutraliser périodiquement la

solution qui s'acidifie au cours du processus. Lorsque la viscosité relative à 25°C atteint la valeur 2,5, on neutralise et on précipite le dextrane avec le double de son volume d'alcool à 96 %, obtenant ainsi après dessiccation 5 kg environ de dextrane présentant une viscosité intrinsèque de 0,06 et un pouvoir réducteur d'après Somogyi de 9 % environ du glucose.

Après quoi, à partir du dextrane obtenu, on prépare une solution aqueuse à 20 % que l'on soumet à l'hydrogénation. A cette fin, on introduit 20 litres de la solution de dextrane à 20 % dans un récipient muni d'un agitateur; on ajoute peu à peu 200 g de borhydrure de sodium. On laisse reposer en agitant de temps à autre. Au bout de 6 heures, on acidifie à l'acide acétique et on déionise à l'aide de résines échangeuses d'ions. On précipite à l'alcool méthylique l'hydrodextrane et l'on obtient 3 kg environ d'un produit présentant les caractéristiques suivantes : pouvoir réducteur vis-à-vis du réactif de Somogyi pratiquement nul; pouvoir rotatoire $[\alpha] = + 170^\circ$; viscosité intrinsèque 0,05.

Pour la sulfatation de l'hydrodextrane obtenu, on procède de la manière suivante. A 8 kg de pyridine refroidie à - 10°C et sous agitation, on ajoute peu à peu 3 kg de SO₂ en maintenant la température au-dessous de 0°C. Après avoir élevé la température à 25-30°C environ, on ajoute 1,6 kg d'hydrodextrane. Le mélange exothermique élève la température qui se maintient entre 65 et 75°C pendant 8 à 10 heures. On refroidit et on neutralise avec 4,9 kg de potasse caustique à 70 % en volume. On laisse reposer, d'où il résulte une séparation de la majeure partie de la pyridine que l'on décante. On dissout à l'eau le liquide épais qui reste au fond et on le soumet à une dialyse en maintenant le pH légèrement alcalin. Après concentration et précipitation à l'acétone, on obtient un liquide visqueux qui, une fois desséché, donne 2,8 kg de sel potassique d'hydrodextrane sulfaté.

Les caractéristiques physicochimiques du produit sont les suivantes :

| | |
|---|-------------------------|
| Cendres | 42,6 % |
| Hydrodextrane | 40,9 % |
| Soufre | 16,5 % |
| Pouvoir rotatoire | $[\alpha] = + 83^\circ$ |
| Pouvoir réducteur équivalent à 50 mg de glucose | 82,1 g |
| Viscosité intrinsèque | 0,04 |

Pour démontrer les effets des sels d'hydrodextrane sulfaté sur le métabolisme des lipides sanguins, on a mené des essais expérimentaux sur des animaux de laboratoire (lapins) que l'on a soumis à un régime cholestérinique élevé et à des traitements par doses de 5 mg/kg. On procéda à l'évaluation des effets antilipémiques en dosant la cholestérine, les lipides totaux et le quotient de lipoprotéines bêta/alpha chez tous les animaux avant de commencer les essais et à des intervalles de temps de 30 à 90 jours à la suite de ces essais; des contrôles analytiques dans des conditions semblables étaient réalisés sur des animaux-témoins qui n'étaient soumis qu'au régime cholestérinique.

Les résultats des essais ont mis en évidence une diminution des taux de cholestérine, des lipides totaux et du quotient bêta/alpha qui ont démontré l'action antilipémique des sels d'hydrodextrane sulfaté, ramenant approximativement les taux lipidiques aux chiffres physiologiques, en comparaison des résultats des groupes-témoins manifestant les effets d'une hyperlipémie expérimentale.

A la fin de l'expérience, tous les animaux ont été sacrifiés afin d'étudier comparativement le poids du foie, la graisse hépatique et la cholestérine dans la graisse hépatique, et les résultats ont également démontré l'action stimulante du produit sur le métabolisme des lipides : chez les animaux traités, les valeurs concernant le poids, les triglycérides et la cholestérine dans la graisse du foie étaient inférieures à celles des animaux témoins. Les sels d'hydrodextrane sulfaté agissent donc en stimulant le métabolisme des lipides et en diminuant les taux de cholestérine, de lipides totaux et le quotient de lipoprotéines bêta/alpha.

Le protéinogramme, également vérifié sur les animaux expérimentaux, est resté normal dans toutes les périodes d'expériences. On a aussi contrôlé le temps de coagulation qui n'a pas varié.

En conséquence, on peut affirmer l'action bénéfique des sels d'hydrodextrane sulfaté sur les taux de cholestérine, de lipides totaux et sur le quotient bêta/alpha, tendant à équilibrer les hyperlipémies obtenues expérimentalement par des régimes spéciaux à base de graisse et de cholestérine, susceptibles de provoquer une athérosclérose expérimentale.

Il est du reste bien entendu que le mode de réalisation de l'invention qui a été décrit ci-dessus à propos des exemples présentés a été donné à titre purement indicatif et nullement limitatif et que de nombreuses modifications peuvent être apportées sans que l'on s'écarte pour cela du cadre de la présente invention.

R E S U M E

5 I° Un polysaccharide sulfaté antilipémique, actif par voie orale, consistant en un sel d'hydrodextrane sulfaté ayant une teneur moyenne de 1 à 3 groupes $-SO_3-$ pour chaque groupe monosaccharide et n'étant pratiquement pas réducteur d'après la méthode de Somogyi.

2° Polysaccharide sulfaté antilipémique, actif par voie orale, consistant en un sel d'hydrodextrane sulfaté présentant une viscosité intrinsèque comprise entre 0,02 et 0,07 à 25°C, une teneur moyenne de 1 à 3 groupes $-SO_3-$ par groupe monosaccharide et n'étant pratiquement pas réducteur d'après la méthode de Somogyi.

40 3° Polysaccharide sulfaté antilipémique, actif par voie orale, consistant en un sel alcalin de l'hydrodextrane sulfaté qui présente une teneur en S de 10 à 20 % par rapport au poids total et n'est pratiquement pas réducteur d'après la méthode de Somogyi.

8157

8 157 M

AVIS DOCUMENTAIRE SUR LA NOUVEAUTE

**Documents susceptibles de porter atteinte à la nouveauté du
médicaments : néant**

Documents illustrant l'état de la technique en la matière :

- Brevet français (B.S.M.) n° 1267 M.